

- 14 Oin S et al. Science, 1993; 259: 974
- 15 Bachh JF et al. Immunology Today, 1993; 14: 322
- 16 Parlevliet KJ et al. J Clin Invest, 1994; 93: 2519
- 17 Gaughan WJ et al. Am J Kidney Dis, 1994; 24(3): 486

- 18 Charpentier B et al. Transplantation, 1992; 57: 997
- 19 Donckier V et al. Transplantation, 1994; 57: 1436
- 20 Alegre ML et al. Transplantation, 1994; 57(11): 153

145 Tat 介导外源蛋白引入活细胞

厦门大学肿瘤细胞工程国家专业实验室 陈亚兵 温龙平综述 曾定审阅

摘要 本文在介绍外源大分子引入细胞的方法及 HIV-1 反式激活因子 Tat 蛋白的结构基础上概述了 Tat 蛋白介导的外源蛋白进入活细胞的方法,并进一步地对其作用机制进行了探讨,认为 Tat 介导的外源大分子引入细胞系统在研究细胞生命活动及临床医学上有重要的意义。

关键词 Tat 蛋白 Tat 嵌合体 运送

外源大分子引入细胞的方法

用蛋白、多肽及寡核苷酸等对细胞内物质运输、表达调控等细胞内活动进行研究以及进行细胞内治疗时,由于它们无法透过细胞膜,较难非破坏性地将这些外源大分子输入活细胞中,因而限制了抗体、基因、酶、多肽及反义寡核苷酸在生物学和医学上的应用。在实验及临床上,已有许多方法用于将蛋白质及其他大分子导入活细胞中,这些方法包括:显微注射、scrape-loading、电穿孔法、脂质体法、细菌毒素及红细胞或受体介导的胞吞作用等,这些方法大都效率不高或费时、引起细胞死亡或形成胞内小泡而不能有效地进入胞质中^[1-8]

通常使用的方法有显微注射术及电穿孔法,显微注射术可将外源的蛋白和核酸输入活细胞,但只限于单细胞操作,而且它是一项高度专业化的技术且需要训练及昂贵的设备,影响了其在实验室广泛使用,电穿孔法则相反,适合于大量的操作,能有效地将 DNA 和蛋白质送入细胞,然而它们都不可避免地导致细胞损伤,即使相当成功也有 50% 的靶细胞被杀死^[1]。scrape loading 可有效地将蛋白输入细胞内,但对 DNA 则效率很低,且损伤细胞膜,可导致 30%~40% 的细胞死亡。超声、冻融、渗透压震荡、去离子剂渗透及其它形式的细胞裂解也在一些特例上得到应用。但是,由于不能使细胞充分复原而限制了这些方法的使用。

红细胞介导的细胞融合曾用于将大量的外

源大分子直接输入培养细胞,但由于需要用外源凝集素、病毒等,而且要将红细胞蛋白也引入靶细胞中,使得接下去的研究工作更加复杂^[6]。一些多肽激素和病毒的受体介导胞吞作用也曾用于将外源大分子引入细胞中,但是这些方法有赖于大分子与细胞表面的结合,然后再由胞吞途径进入细胞内,但是,以这种途径进入细胞的蛋白质仍包裹在脂质小泡中,因此不能进入细胞质中行使功能,在许多情况下由于很多类型的细胞缺乏合适的受体或者进入细胞的外源分子最后进入溶酶体中等等,限制了这些方法的应用^[7]。脂质体介导的外源物质引入也由于脂质体的稳定性及细胞小泡融合效率低而不能广泛应用^[8]。显然,逃脱胞内小泡是将外源大分子真正输入细胞的限制所在,而许多方法都没能做到这点。叶酸介导的胞吞作用可通过外源蛋白质与叶酸的共价结合而将其输入细胞中,此方法是一种自然的维生素胞吞作用,对靶细胞没有明显的伤害,在医学上有一定的应用前景,当然仍有它的局限性^[5]。

最新的研究结果表明,AIDS 病毒 HIV-1 Tat 能有效地将外源大分子输入活细胞中,外源蛋白在细胞质中保持活性,并且其作用不受细胞类型的限制^[9,10]。

反式激活因子 Tat 蛋白

人的免疫缺陷病毒 HIV 编码一些其它反转录病毒中未发现的调节蛋白,如 Tat 蛋白就是由 HIV 的 LTR 中反式激活基因表达的,这

是病毒基因表达及复制所必需的。Tat 定位于核中, HIV 上离病毒启动子 3' 端 50bp 的区域 (TAR 位点) 是 Tat 反式激活所必需的。HIV-1 Tat 基因由两个外显子构成 (分别位于 env 之前和之中), 编码由 86 个氨基酸组成完整的 Tat 蛋白, 由第一外显子所编码的 72 氨基酸蛋白质具有完全的体外反式激活活性, 而且它在 HIV 复制过程中也可能有调控作用。Tat 基因在 HIV-1, HIV-2 和 SIV 间高度保守, 它的表达是这些病毒的复制所必需的, 但 HIV-1 的 Tat 可作用于 HIV-1 和 HIV-2 的 TAR, 而 HIV-2 的 Tat 对 HIV-1 的 TAR 无作用^[11]。

总的来说, 序列区域与其蛋白的功能域是相对应的^[12]。Tat 蛋白有 6 个功能域, 其中第一、第二和第四功能域与反式激活功能相关。

第一功能域是 N 端的一组酸性氨基酸, 含有 2 个 Gln 和一个 Asp, 这与其他已知转录调节蛋白的激活功能区结构是一致的, 因而推测该功能区与 Tat 激活 HIV-1 基因组表达有关^[11, 13], Tat 的第二个功能域富含 Cys, 在 16 个氨基酸残基中就有 7 个, 该肽段可与二价金属离子结合, 并可形成 Tat 二聚体, 在 7 个 Cys 中, 6 个是维持 Tat 活性所必需的, 该肽段能与分子量为 30KD 的细胞核蛋白结合, 富 Cys 区的作用存在争论: 早期认为它是一个锌依赖性二聚体区, 但金属离子结合到 HIV-1 Tat 蛋白富 Cys 区的作用并不清楚, 最近的报道则开始怀疑反式激活活性是否需要金属离子与富 Cys 区结合, 富 Gln 区可能参与 TAR 的结合。

Tat 的第四功能域由一组带正电的碱性氨基酸残基构成, 也称基本区。在所有已知的 Tat 蛋白中其基本区是严格保守的。它主要行使两个功能, 48~52 位氨基酸 GRKKR 作为核-核仁定位保证 (nuclear-nucleolar localization signal), 可介导其自身或异种蛋白进入细胞核, 例如将此肽段与 β -半乳糖苷酶融合即可使后者在核内聚集; 此肽段的第二个功能是与 TAR RNA 凸出部的特异结合, NMR 研究表明, HIV-Tat 的基本区形成 α -helix, 经 Tat 第 52 和 53 位的 Arg 残基与 TAR RNA 的磷酸基团

的相互作用, 同时, HIV-1 Tat 蛋白的核心区是序列专一性的 TAR RNA 结合所必须的。TAR RNA 上的 UCU 凸出部是 Tat 蛋白结合位点, 环区和茎区对结合也有重要的影响。Tat 和 TAR 单纯的结合并不能有效地激活 HIV 基因表达, 还取决于 TAR 序列及其完整的高级结构, 例如 Tat 与环区有突变的 TAR 仍可结合, 但不激活 HIV 的表达, 另外, Tat 与 TAR 对 HIV 复制的调节还需细胞编码蛋白的协同作用以及有赖于其上游的启动子和增强子。

Tat 介导外源蛋白进入活细胞

Frankel 等^[9]证明了外源的 Tat 能被细胞吸收, 输送到核中并仍保留其反式激活 HIV 启动子的活性。Viscidi^[14]和 Ensoli^[15]等发现 Tat 能作为一外在因子影响细胞的表达和调节细胞的增殖。Frankel 等^[9]用 Scrape-loading 法将培养基中的 Tat 蛋白引入细胞质中, 结果发现它能有效地激活 HIV-1 的启动子, 这表明由细菌产生的 Tat 在哺乳动物细胞中是有活性的, 同时还意外地发现: 仅将纯化的 Tat 蛋白加入培养基中, 亦能增加由 HIV-1 启动子所调控的蛋白的表达, 而且表达量与 Tat 蛋白的浓度成正比。另外, 加入 10mM 的锌离子或 1mM 的钙离子对此有促进作用, 说明金属离子可能对 Tat 的吸收及其在细胞内的活性有稳定作用。用氯奎与 Tat 同时作用, 可以使反式激活活性增加 7 000 倍, 而氯奎单独作用则只能很少地增加启动活性。带有 HIV-LTR 的质粒及含有 Tat 的表达质粒共转染 Hela 细胞, 或将纯化的 Tat 加入 HIV-LTR 质粒转染的细胞培养基内均可产生高水平的反式激活活性; 但是, 如果 HIV-LTR 的 TAR 位点发生突变或者表达由 SV40 启动子控制, 则 Tat 的引入不起作用, 这说明外源 Tat 对 HIV-LTR 的反式激活作用似乎与内源性的 Tat 作用机制相同。用 ¹²⁵I 标记的 Tat 进行分析发现, Tat 进入细胞后定位于核中。

Ensoli 等^[15]发现 HIV-1 急性感染 H9 细胞及 Tat 转染 COS-1 细胞所产生的 Tat 能专一性地启动 AIDS-KS 细胞的生长, 但其作用受抗 Tat 抗体的抑制, 重组 Tat 具有相同的作

用。因此,病毒的调控基因产物可以以一个具有生物活性的蛋白释放出来而直接作为生长刺激因子,这些结果表明外源的 Tat 参与了 HIV-1 感染的 Kaposi 肉瘤的形成和发展。Tat 的细胞吸收活性在 HIV-1 病理中的作用仍不清楚。通常认为 Tat 具有以下功能:①激活潜在原病毒 LTR 的活性。②作为 Kaposi 肉瘤细胞的生长因子或在这一癌症的发展中起作用。细胞吸收 Tat 的作用机制有待于进一步的研究,但这一现象的发现无疑揭示了 Tat 功能的另一方面。Tat 可能作为病毒生长因子而起作用,当感染细胞裂解后将 Tat 释放到血清中,被其它细胞吸收,引起病毒的 HIV 启动子的反式激活活性或者引起细胞基因表达的改变。由于 AIDS 病人有 Tat 抗体,Tat 可能某些时候存在于细胞外,如果体内细胞吸收非常重要的话,则在药物的设计上有着重要的应用。Farhood 等^[16]的实验还发现 Tat 蛋白及 Tat 表达载体均能诱导外源基因的表达,但 Tat 蛋白诱导的基因表达较 Tat 表达载体所诱导的表达高 2.6 倍,这一结果表明纯化的 Tat 蛋白作用优于常规的转染方法。

HIV-1 的 Tat 蛋白加在培养液中能有效地被细胞所吸收,因此 Fawell^[10]等将 Tat 与其它蛋白结合以了解它是否可将外源蛋白带入细胞内。将 Tat-(1~72)及 Tat-(37~72)分别与外源蛋白结合,然后将 Tat-蛋白加入培养基中。Tat-(37~72)不含有富 Cys 区减少了处理和分析的复杂性,但它保留了参与细胞结合和吸收的基本区,结果它仍与 Tat-(1~72)相同具有细胞输入功能,且输入细胞质中的外源蛋白仍保持活性,而不与 Tat 结合的蛋白即使培养基浓度很高也无法进入细胞。Tat-蛋白处理后的细胞反复冲洗不影响酶活力,但是用胰酶处理则破坏与细胞的结合,用多聚赖氨酸或精氨酸代替 Tat,嵌合体仍可与细胞结合但却不能进入细胞内。Tat 跨膜的机制及其精确胞内位点仍不清楚,但是 Tat 以每个细胞多达 10^7 位点有效地与细胞结合,然后通过吸附胞吞过程进入细胞内。实验表明:Tat 首先与细胞表面

结合,然后以类似内质网或溶酶体的结构进入胞内,最后在细胞质及细胞核中均有分布。Tat 上的 RNA 结合区至少参与介导 Tat 与细胞表面的结合,当培养液中加入肝素、硫酸葡聚糖等可溶性的多聚阳离子时,吸收活性就被阻断。另外,由于 Tat 的基本区含有 NLS,因此用 SV40 大抗原的含 NSL 序列代替 Tat 进行分析,结果未发现细胞的吸收现象。

为了获得最适的 Tat 活性,Frankel 和 Pabo 发现氯奎能减少 Tat-蛋白的降解,用 Tat 将 HIV-1 LTR 引入细胞的实验发现,加入氯奎后可使其活性大大增加,而 Tat 引入的 β -半乳糖苷酶的活性在加入氯奎后增加不到 2 倍。所以氯奎可能影响“货物蛋白”对细胞内降解的敏感性而并不参与细胞吸收过程。所有测试的细胞中,Tat-蛋白嵌合体均被细胞所吸收,用 Tat- β -半乳糖苷酶注射小鼠,结果在几种组织中均发现了 β -半乳糖苷酶活性,尤以心脏、肝、脾中水平最高,在肺和骨骼肌中低于平均水平,而在肾及脑中则很少或无活性,在这些组织中,最初的靶细胞是血管周围的细胞,如上皮细胞、Kuppfer 细胞及 splenic 巨噬细胞等。

Tat 蛋白与其它大分子结合能有效地将外源大分子输入细胞,这种输入与细胞类型无关,而且“货物分子”进入细胞质中,这些实验表明:这一系统可将作用位点在细胞质中的蛋白或多肽,如细胞内酶的多肽或蛋白抑制剂、转录因子、多肽抗原等导入细胞质中,为理论研究及临床治疗提供可能。

Tat 将外源大分子引进活细胞机制探讨

Tat 能与细胞结合、被细胞吸收从而影响着细胞的行为,说明细胞上有 Tat 受体。

最近,两家实验室发现 Tat 与细胞表面的特殊蛋白结合,进一步说明了这一方式的物质输入可能是受体介导的^[17,18],但是,是否这些特殊的结合参与了细胞对 Tat 的吸收仍有待于进一步的证明。RGD 是包括 fibronectin, vitronectin, fibronogen 在内的一些蛋白与细胞结合所必需的,它们与细胞的结合是由 integrins 介导的,integrins 是由 α 和 β 亚基组成的一个

跨膜受体家族。与 integrin 细胞受体结合的蛋白通常都在 integrin 结合位点中含有 RGD 序列。

HIV-1 Tat 含有两个外显子,第二个外显子编码 14 个氨基酸,其中包括在已知 HIV-1 中高度保守的 RGD 序列(72~74),这是一个众所周知的 integrin 受体识别序列,事实上,Tat RGD 的突变的确能减少它与细胞的结合。

Brake 等的实验证明所有 Tat 与细胞的结合需要 RGD。因为,用 RGD 的 D-E 突变体 RGE 进行实验发现,D-E 的改变足以减少或完全抑制 Tat 介导的细胞结合。另外,两个氨基酸的突变体 KGE 同样使 Tat 完全丧失与细胞的结合。含有 RGE 或 KGE 突变的 Tat 不能有效地与细胞结合表明 Tat 与细胞的结合可能需要 integrin 的参与,进一步用 EDTA、细胞骨架阻断剂及含有 RGD 的多肽进行研究,结果发现 EDTA 可阻止 Tat 与细胞的结合,而加入二价阳离子 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 后结合又恢复。同样,加入细胞松弛素 B 和秋水仙素,Tat 与细胞的结合也受抑制,说明 Tat 与细胞的结合还需要二价阳离子及完整的细胞骨架,许多 integrin 与它们的腺体结合均需要二价阳离子,如 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 等且有大量的证据证明它们是与细胞骨架相连的,以上 Tat 与细胞结合的结果与 integrin 介导的细胞连接完全一致。当存在含有 RGD 的多肽 GRGDSPK 或能识别 RGF 的抗-Tat 表面抗原时,细胞接合受到抑制,这些结果充分说明,细胞是通过 integrin 与 Tat 结合的。

Vogel 等^[18]的实验则发现 Tat 与细胞的结合是它的基本区,而不同 RGD 序列,其基本区中含有 RKKRRQRRR 序列,与 $\alpha\text{v}\beta 5$, vitronectin 的肝素结合序列 KKQRFHRNRKG 相似。这些基本结合位点可能与 RGD 或相关序列识别位点共同作用,促进 Tat 与细胞的结合,尽管以往的实验中都发现 $\alpha\text{v}\beta 5$ integrin 能识别 RGD 序列,但其与 Tat 的结合位点是在 Tat 的基本区而不是 RGD 序列且不需要二价阳离子,用抗 integrin 的抗体可阻止 Tat 与细胞结合,但并不阻断细胞对 Tat 的吸收,这一结

果表明 $\alpha\text{v}\beta 5$ integrin 对细胞吸收 Tat 并不重要。Mann 和 Frankel^[19]等也证明 Tat 的基本区在 Tat 与细胞表面结合的重要性。

Weeks 等用 Tat 多肽亲和层析发现了一个与 Tat 结合的 90KD 的细胞表面蛋白,用 Tat-(49~57)多肽能将 90KD 的蛋白从 Tat 柱上洗脱下来。把 Tat 与细胞膜提取物共同培养,同样也鉴定出一个 90KD 的细胞表面蛋白。Tat-(49~65)能竞争地抑制 Tat 与 90KD 的细胞表面蛋白的结合,而 Tat-(58~86)却不能,说明细胞与 Tat 的结合是通过 90KD 的细胞表面蛋白与 Tat 的 49~57 氨基酸结合来介导的。Weeks 等实验则将 Tat 的细胞结合区定位在不含 RGD 的 Tat 49~57 这 9 个氨基酸序列上,同样证明了 Tat 的基本区对 Tat 与细胞表面结合的重要性,并且认为 Tat 上有多个细胞结合位点及存在多个 Tat 结合蛋白。当然,Tat 介导外源大分子进入细胞的机制还有待于进一步地探讨。

结束语

AIDS 病人的许多病症不与免疫缺陷直接相关,如痴呆、Kaposi 肉瘤等。这些病症的病理仍不清楚,或许与 Tat 的作用相关。细胞与 Tat 结合以及 Tat 在宿主细胞中的活性在 AIDS 病理中起重要的作用。Tat 能将外源大分子引入细胞,为进一步地了解细胞的生命活动以及基因和多肽用于治疗开辟了新的领域,无疑在生物学及临床医学上有重要的意义。

参考文献

- 1 Chakrabarti R et al. J Biol Chem, 1989; 264: 15494-15500
- 2 Connor J & Huang L. J Cell Biol, 1985; 101: 582-589
- 3 McNeil PL et al. J Cell Biol, 1984; 98: 1556-1564
- 4 Okada CY et al. Cell, 1982; 29: 33-41
- 5 Leamon CP et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1991; 88: 5572-5576
- 6 Furusawa M et al. Nature, 1974; 249: 449-450
- 7 Renneisen K et al. J Biol Chem, 1990; 265: 16337-16342
- 8 Harrison ML et al. J IOL, CHEM, 1991; 26: 4106-4111
- 9 Frankel AD & Pabo CO. Cell, 1988; 55: 1189-1193
- 10 Fawell S et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1994; 91: 664-668
- 11 Chang YN et al. Nucl Acids Res, 1992; 20(20): 5465-5472
- 12 Bayer P et al. J Mol Biol, 1995; 247: 529-535

13 Ruben S et al. J Virol,1989;63:1-8

14 Viscidi R et al. Science,1994;246:1606-1608

15 Ensoli B et al. Nature 1990;345:84-86

16 Farhood H et al. Analytical Biochemistry,1995;225:89-93

17 Weeks B et al. J Biol Chem,1993;268:5279-5284

18 Vogel BE et al. J . Cell Biol,1993;121:461-468

19 Mann DA & Frankel AD EMBO J,1991;10:1733-1739

146 表达 T 细胞抗原受体的肠上皮内淋巴细胞

福建省中医药研究院 黄宇雄综述 李柏龄审阅

摘要 TCR⁺肠上皮内淋巴细胞(iIEL)一般可分为两类:一类在肠内发育,包括 CD8 $\alpha\alpha$ ⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺和 CD8 $\alpha\alpha$ ⁺TCR $\gamma\delta$ ⁺细胞,对抗原识别可受或不受 MHC 限制;另一类在胸腺内发育,包括 CD4⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺和 CD8 $\alpha\beta$ ⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺细胞,抗原识别受 MHC 限制。文中还初步介绍了 TCR⁺iIEL 中不同类型细胞在活化、功能和粘附分子表达上的差异及与疾病的关系。

关键词 肠上皮内淋巴细胞 T 细胞抗原受体

肠上皮内淋巴细胞(Intestinal intraepithelial lymphocytes iIEL)是指位于基膜上方肠粘膜上皮细胞之间一群表型及功能异质的淋巴细胞。iIEL 的存在早已发现,Guy-Grand 等(1974)就提出胸导管来的 T 细胞可定位于肠上皮内。Goodman (1988)和 Lefrancois 等(1991)对 TCR $\alpha\beta$ ⁺ iIEL 和 TCR $\gamma\delta$ ⁺ iIEL 的表型和功能进行研究,发现一部分 iIEL 表达独特的 CD8 $\alpha\alpha$ 共二聚体^[1-3],深入研究发现 TCR⁺ iIEL 的表型、来源、效应与其它外周 T 细胞有很大区别^[4-7],本文就其生物学特性和与疾病的关系作一综述。

一、一般特性

人和小鼠 iIEL 主要为 T 淋巴细胞,但也含少量 sIg⁺,K 和 NK 细胞^[1],在 T 细淋巴细胞中有 10%是不成熟的,即不表达 CD3 而表达 CD7 的 T 细胞^[4]。iIEL 多分布在肠绒毛上皮之间,邻近基膜,在肠腺上皮中极少,可脱落到肠腔,其寿命只有 3~4 天。小肠 TCR⁺ iIEL 中,TCR $\gamma\delta$ ⁺ T 细胞比例明显高于其它淋巴器官和外周血,在小鼠可达 31 \pm 11%^[5],而成人则有 13%^[4]。

二、表面标志和分类

TCR⁺ iIEL 多表达 CD8 分子,Lefrancois^[2]对小鼠 CD8⁺ TCR⁺ iIEL 分类的结果(见表 1)初步揭示了该类细胞的独特表型:大部分细胞不表达 CD5 和 Lyt3,而一部分呈 Tyhy1⁻。此外在 iIEL 中 CD4⁺CD8⁻ T 细胞约< 10%^[5],CD4⁻CD8⁻ iIEL 则为数很少^[1,8]。

表 1 小鼠肠上皮内淋巴细胞各亚群的百分数

TCR $\gamma\delta$ iIEL	%	TCR $\alpha\beta$ iIEL	%
Thy1+CD4-8+Lyt3-CD5-	26 \pm 5	Thy1+CD4-8+Lyt3+CD5+	50 \pm 17
Thy1-CD4-8+Lyt3-CD5-	74 \pm 5	Thy1+CD4-8+Lyt3-CD5-	33 \pm 19
		Thy1-CD4-8+Lyt3-CD5-	14 \pm 3
		Thy1-CD4-8+Lyt3+CD5-	4 \pm 3
		Thy1+CD4+8+Lyt3-CD5+	9 \pm 8